

DialogWeb lot2



2/19/1

011201849

WPI Acc No: 1997-179773/199717  
XRAM Acc No: C97-057921

**Screening assay for inhibitors of cyclo-oxygenase-2 gene**

**expression - using Mono Mac 6 cells does not require carcinogenic phorbol ester(s)**

Patent Assignee: NYCOMED AUSTRIA GMBH (NYCO-N); HAFSLUND NYCOMED PHARMA AG (HAFS-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
AT 9600932	A	19970215	AT 96932	A	19960529	199717 B
AT 402936	B	19970815	AT 96932	A	19960529	199738

Priority Applications (No Type Date): AT 96932 A 19960529

**RECEIVED**

JUL 18 2002

TECH CENTER 1800/2900

**COPY OF PAPERS  
ORIGINALLY FILED**

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

AT 9600932 A 11

AT 402936 B Previous Publ. patent AT 9600932

Abstract (Basic): AT 9600932 A

Identification and quantification of substances that inhibit the expression of the cyclo-oxygenase-2 (Cox-2) gene or its induction comprises:

(a) stimulating simultaneously or sequentially cells of the human Mono Mac 6 (MM6) cell line with potential inhibitors of the expression of the cyclo-oxygenase-2 gene and suitable growth and/or differentiation factors of cyclo-oxygenase-2 gene expression, and

(b) measuring the level of Cox-2 gene expression by:

(i) adding arachidonic acid and measuring the concn. of the prods. of cyclo-oxygenase metabolism in the culture supernatant of the cells or

(ii) measuring the amt. of Cox-2 protein produced by the cells by Western blot analysis, protein dot blot analysis, quantitative ELISA or specific protein assay or

(iii) measuring the amt. of Cox-2-specific mRNA produced by the cells by Northern blot analysis, RNA dot blot analysis, quantitative RT polymerase chain reaction or other specific mRNA assay.

N.B., according to the disclosure, step (a) comprises stimulating the MM6 cells with suitable growth and/or differentiation factors before or after incubating the cells with potential inhibitors of Cox-2 expression.

Also claimed is a method as described above in which the MM6 cells are stably or transiently transfected with a promoter-reporter gene construct. The construct comprises the regulatory sequences of the human Cox-2 gene linked to a suitable reporter gene, pref. the firefly luciferase gene. The transfected cells are incubated with potential inhibitors. The treated cells are stimulated with growth and/or differentiation factors, and the expression of the reporter gene is measured using a suitable detection method, pref. chemiluminescence.

ADVANTAGE - It is not necessary to use carcinogenic phorbol esters.

Dwg.0/0

Title Terms: SCREEN; ASSAY; INHIBIT; CYCLO; OXYGENASE; GENE; EXPRESS; MONO; MAC; CELL; REQUIRE; CARCINOGEN; PHORBOL; ESTER

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/26

International Patent Class (Additional): C12Q-001/18; C12Q-001/68;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DialogWeb012

} G01N-033/573

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-F0100E; B04-H02A; B04-H05C; B04-H08; B10-C04E;  
B11-C07; B11-C08; B12-K04; D05-H09

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M760 M903 N102 Q233 V754

\*02\* M423 M750 M903 N102 Q233 V753 V802 V810

Chemical Fragment Codes (M2):

\*03\* H7 H723 J0 J011 J1 J171 M226 M231 M262 M281 M320 M416 M781 M903 M904  
N102 P831 Q233 R04038-D

Chemical Fragment Codes (M6):

\*04\* M903 P831 Q233 R514 R614 R627 R639

Specific Compound Numbers: R04038-D

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2002 Thomson Derwent. All rights reserved.

---

© 2002 The Dialog Corporation plc

*THIS PAGE BLANK (USPTO)*



(11) Nummer: AT 402 936 B

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 932/96

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : C12Q 1/26  
C12Q 1/18, 1/68, G01N 33/573

(22) Anmeldetag: 29. 5.1996

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 2.1997

(45) Ausgabetag: 25. 9.1997

(56) Entgegenhaltungen:

AT 401061B WD 94/14977A1  
C.A. 123(7)1995: 81566X, C.A. 122(13)1995: 154841Z

(73) Patentinhaber:

NYCOMED AUSTRIA GMBH  
A-4021 LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).

(54) BENUTZUNG EINER MENSCHLICHEN ZELLINIE ZUR IDENTIFIKATION UND BESTIMMUNG VON SUBSTANZEN  
ZUR HEMMUNG DER INDUKTION DER EXPRESSION DES CYCOOXYGENASE-2-GENES

(57) Verfahren zur Identifikation und quantitativen Bestim-  
mung von Substanzen, die die Expression des Cyclooxygenase-2 Genes oder dessen Induktion der Expression  
hemmen, dadurch gekennzeichnet, daß  
Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 gleichzeitig  
oder nacheinander mit potentiellen Hemmstoffen der  
Expression des Cyclooxygenase-2 Genes und  
geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren  
der Cyclooxygenase-2 Genexpression stimuliert werden  
und  
a) nach Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration der  
Produkte des Cyclooxygenasesstoffwechsels im Kulturüber-  
stand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsver-  
fahrens gemessen wird, oder  
b) die von den Zellen gebildete Menge an Cox-2 Protein mit-  
tels Westernblot Analyse, Protein Dotblot Analyse, ELISA  
zur quantitativen Cox-2 Protein Bestimmung oder ähnlich  
geeigneter spezifischer Protein nachweisverfahren gemes-  
sen wird, oder  
c) die von den Zellen gebildete Menge an Cox-2 spezifischer  
BotenRNS mittels Northernblot Analyse, RNA Dotblot Analyse,  
quantitativer PCR nach reverser Transkription oder  
ähnlich geeigneter spezifischer BotenRNS-Nachweisverfah-  
ren gemessen wird.

B

936

402

AT

Erfindungsgegenstand

Die Erfindung betrifft die Hemmung der Expression von human-COX-2 in Zellen einer humanen monozytenartigen Zelllinie und dessen Verwendung in einem Verfahren zum Suchen nach und zur Charakterisierung und Bestimmung von Stoffen, die geeignet sind, die Expression des COX-2 Genes und/oder die Induktion der COX-2 Genexpression zu hemmen.

Technologischer Hintergrund

Das Enzym Cyclooxygenase (COX) (Synonyme: Prostaglandin-endoperoxid Synthase, EC 1.14.99.1, Prostaglandin H Synthase (PGHS), Prostaglandin Synthase (PGS)) wandelt Arachidonsäure in Prostaglandin H<sub>2</sub> um, das dann von verschiedenen Enzymen zu den entsprechenden Prostaglandinen (z.B. PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>1α</sub>), Prostacyclinen und Thromboxanen (z.B. TXA<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>) weiter verstoffwechselt wird (Thiemermann, Eicosanoids, Bd.4, Jg. 1991, S.187-202). Zwei Formen, d.h. Isoenzyme, der COX sind bisher beschrieben worden, die mit COX-1 und COX-2 bzw. PGHS-1 und PGHS-2 bezeichnet werden. Diese beiden Isoenzyme werden durch zwei distinkte Gene mit unterschiedlicher Regulation codiert (Battistini et al., DN&P, Bd.7(8), Jg.1994; S.501-512, Smith et al., Ann.N.Y.Acad.Sci., Bd.714, Jg.1994, S.136-142). So ist COX-1 permanent in fast allen Zellen exprimiert und katalysiert z.B. die Bildung von Prostacyclin, das, sekretiert von Magenschleimhautzellen, diese vor der Magensäure schützt (Whittle et al. Nature, Bd.284, Jg.1980, S.271-273). Hingegen wird COX-2 erst auf inflammatorische Stimuli hin in Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten der Haut und anderen Zellen nachweisbar. Diese Stimuli erhöhen die COX-2-Expression um das 10 bis 80-fache (Smith et al., a.a.o.). Inflammatorische Stimuli *in vivo* sind pro-inflammatorische Cytokine oder bakterielle Endotoxine, *in vitro* sind es Mitogene, Cytokine und Lipopolysaccharid (LPS). Die dann sekretierten Mediatoren, wie z.B. PGE<sub>2</sub> sind u.a. für das entzündliche Geschehen verantwortlich. Die Unterdrückung der Bildung von COX-2 ist eine Wirkung von steroidhaltigen Medikamenten wie zum Beispiel Dexamethason und trägt wesentlich zur entzündungshemmenden Wirkung dieser Stoffe bei.

Verfahren zur Testung der Hemmung der COX-2 Gen Expression

Zur Expression von human COX-2 und Testung auf Inhibition der human COX-2 sind Verfahren beschrieben worden, die sich peripherer Makrophagen/Monozyten bedienen, die nach Isolierung aus dem Blut von Spendern mit LPS stimuliert werden. Dieses Verfahren ist umständlich und zeitraubend. Humane Zelllinien (U937, THP-1, HL60), die nach Stimulation mit Phorbolestern (TPA, PMA) COX-2 exprimieren, sind ebenfalls beschrieben worden (Hoff et al., FEBS, Bd.320, Jg.1993, S.38-42, Sanduja et al., Blood, Bd.78, Jg.1991, S.3178-3185), und der Gebrauch von Zelllinien stellt insofern eine Verbesserung dar, indem der Schritt der Isolierung von Monozyten aus dem Spenderblut und die große Streuung der Stimulierbarkeit der Spendermonozyten entfallen. Der Nachteil der PMA-Stimulation der beschriebenen human Zelllinien besteht jedoch in der Gefährlichkeit im Umgang mit PMA, sodaß diese Verfahren nicht für einen Routinegebrauch geeignet sind. Des weiteren ist PMA kein natürlicher Stimulus zur Aktivierung von Makrophagen.

Überraschenderweise konnte ein Verfahren gefunden werden, das die Nachteile der oben angeführten Verfahren umgeht, da es einfacher durchzuführen und somit zeitsparender ist, die Handhabung der carcinogenen Phorbolester unnötig macht, und vor allem aber Stimulantien benutzt, die auch in der Natur vorkommen.

Die Erfindung beschreibt die durch beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Expression von human-COX-2 in Zellen einer humanen monozytenartigen Zelllinie und dessen Anwendung in einem Verfahren zum Suchen nach und zur Charakterisierung und Bestimmung von Stoffen, die geeignet sind die Induktion der Expression und/oder die Expression des human-COX-2 Genes zu hemmen.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Identifikation und quantitativen Bestimmung von Substanzen, die die Genexpression des menschlichen Enzyms Cyclooxygenase-2 hemmen, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden, und unter der Stimulation potentielle Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 Genexpression mit-inkubiert werden oder
- b) Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 inkubiert werden, diese Zellen anschließend mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren stimuliert werden,
- c) das Maß der Genexpression des Cyclooxygenase Genes dadurch bestimmt wird, daß

AT 402 936 B

c.1) nach Zugabe von Arachidonsäure am Ende der Stimulationsphase die Konzentration oder Menge der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird, oder

5 c.2) am Ende der Stimulationsphase die Zellen mittels geeigneter Detergentien lysiert werden, der Gehalt von spezifischen Cyclooxygenase-2 Protein in den Lysaten vermittels Western Blot Analyse, Proteindot blot Analyse, ELISA oder ähnlich geeigneter spezifischer Proteinnachweisverfahren bestimmt wird, oder

10 c.3) am Ende der Stimulationsphase die Zellen mittels geeigneter Methoden lysiert werden, Boten-Ribonukleinsäuren (mRNS) isoliert werden und der Gehalt von spezifischen Cyclooxygenase-2 mRNS mittels Northern Blot Analyse, mRNS Dotblot Analyse, oder reverser Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) oder S1 Nukleaseprotektionstest oder irgendeinem sonstigen geeigneten spezifischen mRNS-Nachweisverfahren bestimmt wird, oder

15 c.4) Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit einem Reportergenhaltigem Plasmid oder Vector, das die genregulativen Sequenzen des menschlichen Cyclooxygenasegens zur Expression eines Reportergen z. B. des Fireflyluciferase-Gens, des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens oder irgendeines anderen geeigneten Reportergens stabil oder transient transfiziert wurden, dann wie unter a) oder b) stimuliert wurden und sodann die Expression des Reportergenproduktes mittels geeigneter Verfahren z.B. Chemilumineszens oder Farbstoffentwicklung oder ähnlich geeigneter Verfahren als Maß der Cyclooxygenase-2 Genexpression bestimmt wird.

20 In der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock et al., Int.J.Cancer, Bd.41; Jg. 1988, S.456 - 461) wurde überraschenderweise nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) COX-2 im Zytoplasma gefunden. Vorhandensein von COX-2 in MM6 Zellen nach Stimulation durch LPS wurde einerseits mittels zytoplasmatischer Immunfluoreszenz unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen menschliches COX-2 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) und 2) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese des Zellsatzes und nachfolgendem Westernblot unter Verwendung des oben genannten spezifischen Antikörpers gegen menschliches COX-2 gezeigt. Des weiteren wurden die Produkte PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , PGE<sub>2</sub> und TXB<sub>2</sub> des Stoffwechselweges der Cyclooxygenasen im Kulturüberstand von stimulierten und unstimulierten Zellen mittels ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) bestimmt und eine vielfach höhere Konzentration dieser Stoffe in den mit LPS stimulierten Kulturen gefunden. Weiters wurde sowohl mittels Northernblotanalyse als auch mittels Reversertranskription und Polymerasenkettreaktion (PCR) gefolgt von Southernblot analyse der PCR-Produkte das stimulations-abhängiges Auftreten und Ansteigen der Cox-2 spezifischen mRNA gefunden.

30 Diese Befunde zeigen klar, daß sich das Enzym COX-2 in diesen Zellen durch Stimulierung mit LPS induzieren läßt. Im Gefolge dessen wurde ein Verfahren zum Suchen und Bestimmen von Hemmstoffen der Cox-2 Genexpression bzw der Induktion der Cox-2 Genexpression entwickelt.

35 Dazu werden beispielsweise Zellen mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 Genexpression, gelöst in Kulturmedium oder einem Zellkulturverträglichen Lösungsmittel, beispielsweise phosphat gepufferter Saline, inkubiert und mit einem geeigneten Faktor, wie Lipopolysaccharaid die Zellen stimuliert. Danach kann mit verschiedenen Nachweisverfahren die Hemmung der Cox-2 Genexpression bzw. die 40 Hemmung der Induktion der Cox-2 Genexpression erfaßt werden: a) Bestimmung der Cox-2 Enzymaktivität, b) Bestimmung der Cox-2 Proteinmengen, c) Bestimmung der Cox-2 spezifischen BotenRNA. Eine Reduktion der gemessenen Cox-2 spezifischen Enzymaktivität oder der Cox-2 Proteinmengen oder der Cox-2 spezifischen BotenRNA im Vergleich zu einem Kulturansatz, der statt potentieller Hemmstoffe nur Lösungsmittel enthielt, wird als Hemmung der Cyclooxygenase-2 Genexpression gewertet.

45 Anstelle der Messung der Cyclooxygenase-2 spezifischen Enzymaktivität oder der Cox-2 Proteinmengen oder der Cox-2 spezifischen Boten-RNA werden beispielsweise die Zellen mittels eines Promotor-Reportergenkonstrukts gentechnologisch so verändert, daß die Expression des Cox-2 Genes auch zur Expression eines leichter erfaßbaren Genprodukts führt, nämlich das eines Reportergens z.B. des Gens das für das Enzym Firefly Luziferase kodiert. Aus einer cDNA-Bibliothek wird mittels PCR ein geeignetes DNA-Fragment aus den Cox-2 genregulativen Sequenzen (Promotorregion) amplifiziert, kloniert und in ein Plasmid, das das Gen für Firefly Luziferase enthält, insertiert. Dieses Plasmid wird in die Zelle n stabil oder transient eingebracht, die Zellen dann mit potentiellen Hemmstoffen der Cyclooxygenase-2 Genexpression, gelöst in Kulturmedium oder einem Zellkultur-verträglichen Lösungsmittel, beispielsweise phosphat gepufferter Saline, inkubiert und mit einem geeigneten Faktor, wie Lipopolysaccharaid stimuliert. Danach wird die 50 Aktivität der Firefly Luziferase durch Hinzugabe von Substrat beispielsweise Luziferin mittels Chemolumineszenz bestimmt. Eine Reduktion der Chemolumineszenz im Vergleich zu einem Kulturansatz, der statt potentieller Hemmstoffe nur Lösungsmittel enthielt, wird als Hemmung der Cyclooxygenase-2 Genexpression gewertet.

## AT 402 936 B

### Beispiel 1

Mono Mac 6 Zellen werden mit potentiellen Hemmstoffen der Expression des Cyclooxygenase-2 Genes, gelöst in Kulturmedium (RPMI 1640 angereichert mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 160 µg/ml nicht-essentielle Aminosäurenmischung (Sigma), 10000 U/ml Penizillin, 10 ng/ml Streptomycin, 8.2 µg/ml Insulin, 1 mM Oxalessigsäure 1 mM Pyruvat) inkubiert (10 min, Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit), und dann mit LPS (100ng/ml) für 6 Stunden stimuliert (Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit). Danach wird das Kulturmedium erneuert. Arachidonsäure wird hinzugefügt und 15 Minuten weiter inkubiert. Der Kulturüberstand der Zellen wird abgehoben und auf seinen Gehalt an Produkten des Cyclooxygenasestoffwechsels hin mittels ELISA gemessen als Maß der Cox-2 Enzymaktivität, das unter diesen Umständen das Maß der Cox-2-Genexpression reflektiert.

Tabelle 1

15

20

	PGE <sub>2</sub>	PGF <sub>1</sub>	TXB <sub>2</sub>
Zellen nicht stimuliert	5.2%	6%	4.3%
Zellen plus Dexamethason stimuliert	27%	40%	34%
Zellen plus Cycloheximid stimuliert	7%	9%	5%

(Prozentsatz der maximalen Eicosanoidproduktion von LPS-stimulierten Zellen ist angegeben)

### Beispiel 2

Mono Mac 6 Zellen werden mit potentiellen Hemmstoffen der Expression des Cyclooxygenase-2 Genes, gelöst in Kulturmedium (RPMI 1640 angereichert mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 160 µg/ml nicht-essentielle Aminosäurenmischung (Sigma), 10000 U/ml Penizillin, 10 ng/ml Streptomycin, 8.2 µg/ml Insulin, 1 mM Oxalessigsäure 1 mM Pyruvat) inkubiert (10 min, Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit), und dann mit LPS (100ng/ml) für 6 Stunden stimuliert (Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit). Danach werden die Zellen lysiert, normalisierte Mengen des Zellylates einer Westernblotanalyse unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen human Cox-2 unterzogen. Die quantitative Bestimmung der Cox-2 Proteinkonzentration als Maß der Genexpression wird mittels Densitometrie der 72-74KD Doppelbande durchgeführt.

Tabelle 2

40

45

	Densitometrische Einheiten
Zellen nicht stimuliert	53248
Zellen LPS-stimuliert	216373
Zellen plus Dexamethason dann LPS-stimuliert	140846

### Patentansprüche

- Verfahren zur Identifikation und quantitativen Bestimmung von Substanzen, die die Expression des Cyclooxygenase-2 Genes oder dessen Induktion der Expression hemmen, dadurch gekennzeichnet, daß  
Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 gleichzeitig oder nacheinander mit potentiellen Hemmstoffen der Expression des Cyclooxygenase-2 Genes und geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren der Cyclooxygenase-2 Genexpression stimuliert werden und
  - nach Zugabe von Arachidonsäure die Konzentration der Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels im Kulturüberstand dieser Zellen mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens gemessen wird, oder

AT 402 936 B

- 5                   b) die von den Zellen gebildete Menge an Cox-2 Protein mittels Westernblot Analyse, Protein Dotblot Analyse, ELISA zur quantitativen Cox-2 Protein Bestimmung oder ähnlich geeigneter spezifischer Proteinnachweisverfahren gemessen wird, oder  
c) die von den Zellen gebildete Menge an Cox-2 spezifischer BotenRNS mittels Northernblot Analyse, RNA Dotblot Analyse, quantitativer PCR nach reverser Transkription oder ähnlich geeigneter spezifischer BotenRNS-Nachweisverfahren gemessen wird.
- 10                 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit einem Promotor – Reportergen bestehend aus den genregulativen Sequenzen des humanen Cox-2 Genes gekoppelt an ein geeignetes Reportergen, bevorzugt das Gen für Firefly Luziferase, stabil oder transient transfiziert sind,  
die so gentechnologisch modifizierten Zellen der menschlichen Zelllinie Mono Mac 6 mit potentiellen Hemmstoffen inkubiert werden,  
die solchermaßen behandelten Zellen mit geeigneten Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren der Cyclooxygenase-2 Genexpression stimuliert werden und die Expression des Reportergenes mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens, bevorzugt Chemilumineszenz, gemessen wird.
- 15                 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wachstums- und/oder Differenzierungsfaktoren Interleukin-1, TNF-alpha, Lipopolysaccharid oder Interferon- $\gamma$  oder Kombinationen davon, bevorzugt Lipopolysaccharid, verwendet werden.

25

30

35

40

45

50

55

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**